

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 novembre 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/087579 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 31/443, 33/32, A61P 1/16

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/01457

(22) Date de dépôt international : 26 avril 2002 (26.04.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/05606 26 avril 2001 (26.04.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **UNIVERSITE RENE DESCARTES (PARIS V)** [FR/FR]; 12, rue de l'école de médecine, F-75006 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BATTEUX, Frédéric** [FR/FR]; 17, rue des Desnouettes, F-75015 Paris (FR). **WEILL, Bernard** [FR/FR]; 7, allée Mauchain, F-95600 Eaubonne (FR).

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF MANGAFODIPIR FOR TREATING OXIDATIVE STRESS EFFECTS

(54) Titre : UTILISATION DU MANGAFODIPIR DANS LE TRAITEMENT DES EFFETS D'UN STRESS OXYDATIF

(57) Abstract: The invention concerns the use of Mangafodipir to obtain a medicine for preventive or curative treatment of hepatocellular deficiencies.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation du Mangafodipir pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif d'insuffisances hépatocellulaires.

WO 02/087579 A1

**UTILISATION DU MAGAFODIPIR DANS LE TRAITEMENT  
DES EFFETS D'UN STRESS OXYDATIF.**

L'invention est relative à l'utilisation du Mangafodipir dans le cadre du traitement des insuffisances  
5 hépatocellulaires.

Le manganèse dipyridoxyl phosphate (Mn-DPDP), également dénommé Mangafodipir (DCI), est utilisé en radiologie comme produit de contraste paramagnétique dans le cadre du diagnostic par IRM (imagerie par résonnance  
10 magnétique) ; pour revue sur les propriétés du Mangafodipir, cf. ROCKLAGE et al., Inorg. Chem., 28, 477-485, (1989).

Certaines propriétés pharmacologiques du Mangafodipir ont également été rapportées : ASPLUND et al., (J. Pharmacol. Exp. Therapeutics, vol.271, no.2, p.609-614,  
15 1994) décrivent ses propriétés vaso-dilatatrices, attribuées à un effet de stabilisation du monoxyde d'azote produit par les cellules de l'endothélium vasculaire ; ces auteurs indiquent que cet effet pourrait découler d'une activité de type superoxyde dismutase (SOD). BRUROK et al. (Biochem.  
20 Biophys. Res. Commun., vol.254, no.3, p.768-772, 1999) ont observé *in vitro* ses propriétés de mimétique de la SOD, se traduisant *ex vivo* par une action cardioprotectrice vis-à-vis des effets des radicaux oxygénés libres  $O_2^-$  et  $OH^-$  générés lors d'une hypoxie suivie de réoxygénation. La Demande PCT  
25 WO 97/49409 propose l'utilisation du Mangafodipir ou d'autres agents chélatants dérivés de dipyridoxyle ou d'acide aminopolycarboxylique dans le cadre du traitement de pathologies induites par les radicaux libres, à savoir les lésions résultant d'une ischémie-reperfusion, intervenant  
30 notamment au cours de l'infarctus ou d'autres maladies cardiovasculaires, ou les pathologies pro-inflammatoires telles que les lésions induites par les radiations. La Demande PCT WO 99/33521 propose l'utilisation de ces mêmes agents chélatants pour traiter l'athérosclérose, en prévenant  
35 l'oxydation des LDL (low density lipoproteins) ou comme agents cytotoxiques pour traiter des infections par des bactéries ou des protozoaires, ou comme agents détoxifiants

pour le traitement d'intoxications par des métaux tels que le fer.

Les diverses utilisations thérapeutiques du Mangafodipir proposées ci-dessus découlent principalement de ses propriétés de mimétique de superoxyde dismutase. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1) intervient dans la détoxification des radicaux oxygénés libres, en catalysant la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). On distingue différents types de superoxyde dismutase, parmi lesquels on citera notamment les superoxyde dismutases à cuivre et zinc (CuZnSOD), également connues sous la désignation superoxyde dismutase-1, qui, chez les organismes eucaryotes, sont principalement localisées dans le cytoplasme, et les superoxyde dismutases à manganèse (MnSOD), également connues sous la désignation superoxyde dismutase-2, que l'on trouve principalement chez les procaryotes et dans les organites intracellulaires des cellules eucaryotes.

L'utilisation de mimétiques de la SOD a été proposée dans le cadre de diverses pathologies impliquant un stress oxydant provoqué par les radicaux oxygénés libres [pour revue cf. PATEL et DAY, Trends Pharmacol. Sci., 20, 359-364 (1999)]. Cependant, leur efficacité est inégale selon la pathologie concernée.

Ainsi, lors de travaux antérieurs concernant l'insuffisance hépatocellulaire, qui est une des nombreuses pathologies dans laquelle un rôle potentiel des radicaux oxygénés libres a été évoqué, les Inventeurs ont observé qu'un mimétique de la CuZnSOD, le CuDIPS (Cu[II]-[diisopropylsalicylate]), n'avait aucune effet significatif ; en revanche, ils ont constaté qu'un mimétique de la MnSOD, le MntBAP [Mn(III)-tetrakis-(5,10,15,20-benzoïc acid)-porphyrin], possédant également une activité catalase et une activité glutathion peroxydase, avait un effet préventif et curatif notable (Demande PCT/WO 01/12327 ; FERRET et al., Hepatology, vol.33, no.5, p.1173-1180, mai 2001).

Cette efficacité du MntBAP pourrait s'expliquer par ses activités catalase et glutathion peroxydase, qui

complèteraient son activité SOD en permettant la détoxification du peroxyde d'hydrogène généré par dismutation de l'anion superoxyde.

5 Pour vérifier cette hypothèse, les Inventeurs ont entrepris de rechercher d'autres mimétiques de la SOD possédant des activités de détoxification d'espèces oxygénées réactives autres que l'anion superoxyde, et de tester leur effet sur l'insuffisance hépatocellulaire.

10 Ils ont ainsi constaté que, contrairement à ce qui avait été précédemment rapporté (BRUROK et al., 1999 précité), le Mangafodipir possédait comme le MntBAP, une activité catalase, et qu'il possédait en outre une activité glutathion réductase. Ils ont aussi observé que son efficacité vis-à-vis de l'insuffisance hépatocellulaire était  
15 au moins égale à celle du MntBAP.

La présente invention a pour objet l'utilisation du Mangafodipir pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif d'une insuffisance hépatocellulaire.

20 On désigne sous le terme d'insuffisance hépatocellulaire un ensemble de manifestations pathologiques résultant de la destruction des hépatocytes. Selon l'étendue de la destruction cellulaire, ces manifestations cliniques sont plus ou moins graves et réversibles. Dans des cas  
25 extrêmes, la destruction massive et subite des hépatocytes aboutit à une insuffisance hépatique aiguë, également dénommée hépatite fulminante, qui peut entraîner la mort en quelques jours.

Parmi les causes les plus fréquentes de  
30 destruction des hépatocytes pouvant entraîner une insuffisance hépatocellulaire on mentionnera notamment les infections virales, dues aux différents types de virus de l'hépatite, ainsi que les intoxications, notamment par certains médicaments ou par l'alcool.

35 On dispose actuellement de plusieurs modèles animaux d'insuffisance hépatocellulaire de différentes origines, qui permettent notamment d'induire expérimentalement une insuffisance hépatique aiguë, et

d'étudier les mécanismes aboutissant à la destruction cellulaire. Différents mécanismes impliquant des radicaux oxygénés libres ont ainsi été proposés.

Par exemple, l'insuffisance hépatique aiguë  
5 d'origine toxique, induite notamment par l'acétaminophène, résulte d'une saturation des mécanismes normaux de détoxification hépatique. En effet, aux doses pharmacologiques, l'acétaminophène est principalement éliminé par glucoro- et sulfo-conjugaison, mais est également oxydé par le cytochrome  
10 P450 en N-acétyl-p-benziquinone-imine (NAPQI), qui peut normalement être ensuite éliminée après conjugaison avec le glutathion. En cas de surdosage, on observe la saturation des voies de glucoro- et sulfo-conjugaison, et une production accrue de NAPQI [PRESCOTT, Drugs, 25, 290-314, (1983)]. Ce  
15 métabolite très réactif est supposé être l'effecteur principal des lésions des hépatocytes, et les traitements médicamenteux proposés sont basés essentiellement sur l'utilisation d'antioxydants, tels que la N-acétyl-L-cystéine, qui ont pour but de permettre la reconstitution des  
20 réserves intracellulaires de glutathion et la neutralisation du NAPQI. L'efficacité de ces traitements est toutefois inconstante [CARACENI et VAN THIEL, Lancet, 345, 163-169, (1995) ; SCHIOT et al., N. Engl. J. Med., 337, 1112-1117, (1997)], et en cas d'hépatite fulminante, la greffe du foie  
25 constitue actuellement le seul traitement réellement efficace.

Dans le cas de l'insuffisance hépatocellulaire induite par l'alcool, plusieurs mécanismes ont été proposés, faisant intervenir notamment la génération de métabolites  
30 toxiques comme l'acétaldéhyde, l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène.

Les Inventeurs ont testé l'effet du Mangafodipir sur l'insuffisance hépatique aiguë d'origine toxique, en utilisant un modèle expérimental d'insuffisance hépatique  
35 aiguë induite par administration d'acétaminophène. Ils ont ainsi constaté que l'administration du Mangafodipir permet d'augmenter très significativement le taux de survie après administration d'une dose létale d'acétaminophène, et d'en

réduire considérablement les effets toxiques. Il apparaît donc que le Mangafodipir protège très efficacement les hépatocytes des effets destructeurs de substances toxiques, et exerce ainsi un effet à la fois préventif et curatif sur  
5 l'insuffisance hépatocellulaire, notamment d'origine toxique (médicamenteuse ou induite par l'alcool).

En outre, les Inventeurs ont constaté que les effets bénéfiques du Mangafodipir sont observés non seulement lorsque celui-ci est administré à titre préventif, mais  
10 également lorsqu'il est administré à titre curatif, c'est à dire après l'apparition des premiers effets hépatotoxiques.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, le Mangafodipir est utilisé pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement préventif  
15 ou curatif d'une insuffisance hépatocellulaire d'origine toxique, et notamment au traitement d'une insuffisance hépatocellulaire induite par l'acétaminophène, ou d'une insuffisance hépatocellulaire induite par l'alcool.

Le Mangafodipir peut en particulier être utilisé  
20 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement d'une insuffisance hépatocellulaire aiguë, se manifestant notamment sous forme d'une hépatite fulminante.

L'activité glutathion réductase du Mangafodipir qui permet de régénérer le pool intracellulaire de  
25 glutathion, complète avantageusement son activité SOD et son activité catalase, notamment dans le cadre du traitement de l'insuffisance hépatique aiguë d'origine toxique, par exemple celle induite par l'acétaminophène.

Pour la mise en œuvre de la présente invention,  
30 le Mangafodipir sera généralement employé dans des formulations permettant l'administration d'une dose de principe actif comprise entre 0,1 et 10 mg/kg/jour (administration de façon préventive) ou entre 5 et 50 mg/kg/jour (administration de façon curative) ; des doses  
35 plus élevées peuvent toutefois être utilisées, compte tenu de la faible toxicité de ce produit. Il est bien entendu que l'homme de l'art peut adapter ces doses en fonction des

particularités de chaque patient et de la pathologie concernée.

Dans le cadre de la mise en œuvre de la présente invention, le Mangafodipir peut être administré par différentes voies. Généralement, il sera administré par voie orale, ou par injections, en particulier par injections sous-cutanées, intra-musculaires ou intra-veineuse. D'autres voies d'administration pourront être envisagées si elles augmentent l'efficacité, la biodisponibilité ou la tolérance des produits.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs démontrant les activités SOD, catalase, et glutathion réductase du Mangafodipir et ses effets *in vitro* et *in vivo* sur l'insuffisance hépatocellulaire.

#### **EXEMPLE 1 : ACTIVITE MIMETIQUE DE LA SOD DU MANGAFODIPIR.**

L'activité SOD d'un composé chimique peut être déterminée par la méthode de réduction du NBT (nitro bleu de tétrazolium) selon la technique décrite par BEAUCHAMP et FRIDOVICH [Anal. Biochem., 44(1), 276-87, (1971)].

Le test est réalisé à 25°C dans un volume final de tampon de 0,8 ml (50mM TRIS/HCl, pH 7,6), contenant 22 µM de xanthine, 500 U/ml de catalase et 0,2 U/ml de xanthine oxydase. La réduction du NBT, en présence de 1,5 µg de Mangafodipir, ou à titre de contrôle, en l'absence de Mangafodipir, est mesurée toutes les 30 secondes pendant 5 minutes. Une unité SOD (U SOD) est définie par la quantité d'enzyme capable d'inhiber le taux de réduction du NBT de 50%.

Les résultats sont illustrés dans la figure 1.  
Légende de la Figure 1 :

◆ : Contrôle

■ : Mangafodipir (1,5 µg)

Ils montrent que la vitesse de réduction du NBT passe de 0,0302/minute à 0,01556 lorsque 1,5 µg de Mangafodipir est ajouté dans le mélange réactionnel. A partir

de ces résultats, l'activité SOD du Mangafodipir a été évaluée à 680 U SOD par milligramme de Mangafodipir.

**EXEMPLE 2 : ACTIVITE MIMETIQUE DE LA CATALASE DU MANGAFODIPIR.**

5 Le dosage de l'activité catalase a été réalisé selon la méthode décrite par AEBI [Methods Enzymol., 105, 121-126, (1984)]. La décroissance de la densité optique (DO) à 240 nm d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM en tampon phosphate (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) a été mesurée en  
10 présence de 75,7 µg de Mangafodipir, ou à titre de référence, en présence de 1 unité de catalase bovine.

Dans ces conditions, l'activité catalase du Mangafodipir a été évaluée à 2 U catalase par milligramme de Mangafodipir.

15 **EXEMPLE 3 : ACTIVITE MIMETIQUE DE LA GLUTHATION REDUCTASE DU MANGAFODIPIR.**

Le dosage de l'activité glutathion réductase à été réalisé à l'aide de la trousse: « Gluthathione reductase assay kit » commercialisée par la société CALBIOCHEM. Le  
20 mélange réactionnel est analysé par spectrophotométrie à 340nm pendant 5 minutes.

L'activité glutathion réductase du Mangafodipir a été évaluée à 19,9 ± 1,75 mU glutathion réductase par milligramme de Mangafodipir.

25 **EXEMPLE 4 : ACTIVITE PROTECTRICE DU MANGAFODIPIR SUR DES HEPATOCYTES EN CULTURE SOUMIS A L'ACTION DE L'ANION SUPEROXYDE O<sub>2</sub><sup>-</sup>.**

La lignée de cellules hépatiques humaines Hep 3B a été utilisée pour ces expériences.

30 Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de culture de 96 puits, à raison de 5x10<sup>4</sup> cellules par puits, dans un volume final de 50 µl.

Cent µl de solution de Mangafodipir à différentes concentrations (62,5, 125, 250 µg/ml) ont été déposés dans  
35 chaque puits (trois puits par concentration testée). Après une heure d'incubation, 50 µl d'une solution de xanthine à 200 µM et de 2 U/ml de xanthine oxydase (solution X/XO) ont



été déposés dans chaque puits. Dix puits n'ont pas reçu de solution X/XO et ont servi de témoins pour évaluer la viabilité de base des cellules. Douze heures après le dépôt de la solution X/XO, les cellules ont été lavées avec une solution saline et la viabilité déterminée grâce à un test au MTT. Une solution de MTT 0,2% a été déposée dans chaque puits et incubée 4 heures à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées et le test révélé par addition dans chaque puits de 50 µl de Diméthylsulfoxyde (DMSO). Les plaques ont ensuite été lues au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm.

Les résultats (pourcentage de viabilité en fonction de la concentration en Mangafodipir) sont illustrés par la figure 2.

Ces résultats montrent que l'addition de Mangafodipir prévient la mortalité des cellules hépatiques soumises à un stress oxydant médié par l'anion superoxyde.

**EXEMPLE 5 : ACTIVITE PROTECTRICE DU MANGAFODIPIR SUR DES HEPATOCYTES EN CULTURE SOUMIS A L'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

La lignée de cellules hépatiques humaines Hep 3B a également été utilisée pour ces expériences.

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de culture de 96 puits, à raison de 5x10<sup>4</sup> cellules par puits, dans un volume final de 50 µl.

Cent µl de solution de Mangafodipir à différentes concentrations (62,5, 125, 250 µg/ml) ont été déposés dans chaque puits (trois puits par concentration testée). Après une heure d'incubation, 50µl d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 4mM ont été déposés dans chaque puits. Dix puits n'ont pas reçu d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et servent de témoins pour évaluer la viabilité de base des cellules. Douze heures après le dépôt de la solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les cellules ont été lavées avec une solution saline et la viabilité déterminée grâce à un test au MTT, comme décrit dans l'exemple 4 ci-dessus.

Les résultats (pourcentage de viabilité en fonction de la concentration en Mangafodipir) sont illustrés par la figure 3.

Ces résultats montrent que l'addition de Mangafodipir prévient la mortalité des cellules hépatiques soumis à un stress oxydant médié par le peroxyde d'hydrogène.

**EXEMPLE 6 : ACTIVITE DU MANGAFODIPIR SUR L'INSUFFISANCE HEPATIQUE AIGUE INDUITE PAR L'ACETAMINOPHENE.**

L'injection intrapéritonéale d'acétaminophène chez la souris induit une hépatotoxicité sévère, dont le degré peut être évalué par la survie des animaux, et l'examen macroscopique et microscopique des foies.

**Survie des animaux**

Le Mangafodipir, (commercialisé sous le nom de TESLASCAN par Nicomed-Amersham) est administré sous forme de bolus, par voie intrapéritonéale.

L'acétaminophène (APAP), en solution à 100 mg/ml dans du PBS à pH 7,4 est administré par voie intrapéritonéale.

Dans une première série d'expérimentations, un groupe de souris a reçu une dose de 1000 mg/kg d'acétaminophène ; un second groupe a reçu une dose de 1000 mg/kg d'acétaminophène, et une dose de 10 mg/kg de Mangafodipir administrée soit 2 h avant l'acétaminophène, soit 6 h après ; un groupe témoin a reçu soit du Mangafodipir seul (10 mg/kg), soit du PBS seul.

La survie des animaux est suivie pendant 24 heures après l'administration d'acétaminophène.

Groupe I : PBS

Groupe II : APAP 1000 mg/kg

Groupe III : APAP 1000 mg/kg + Mangafodipir 10 mg/kg préventif

Groupe IV : APAP 1000 mg/kg + Mangafodipir 10 mg/kg Curatif

Les résultats (nombre d'animaux survivants) sont résumés dans le tableau I ci-après :

Tableau I

Temps (heures)	0	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	22	24
Groupe I (n=16)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Groupe II (n=12)	12	12	10	9	8	6	5	5	4	4	4	3	3	3	2	2
Groupe III (n=12)	12	12	12	12	11	11	11	10	10	10	9	9	9	9	8	8
Groupe IV (n=12)	12	12	11	11	10	9	9	8	8	8	7	7	7	6	6	5

Ces résultats montrent que 24 heures après l'injection d'acétaminophène, 16% des animaux intoxiqués par l'APAP à la dose de 1000 mg/kg sont morts, alors que le taux de survie est supérieur à 41% chez les animaux intoxiqués par l'APAP mais ayant reçu le Mangafodipir après l'administration d'acétaminophène (protocole curatif), et de l'ordre de 66% chez les animaux ayant reçu le Mangafodipir avant l'administration d'acétaminophène (protocole préventif).  
Aucun décès n'est observé chez les animaux ayant reçu le PBS seul.

#### Etude histologique

Dans chacun des groupes, les foies de plusieurs animaux ont été prélevés, pour effectuer une étude histologique. Dans le cas des souris ayant reçu de l'acétaminophène on observe beaucoup moins de lésions apoptotiques chez les animaux traités au Mangafodipir que chez les animaux non traités. Aucune lésion apoptotique n'est visible chez les souris du groupe témoin n'ayant pas reçu d'acétaminophène.

#### **EXEMPLE 7 : COMPARAISON DES ACTIVITES DU MANGAFODIPIR, DU MNTBAP, ET DU CUDIPS SUR L'INSUFFISANCE HEPATIQUE AIGUE INDUITE PAR L'ACETAMINOPHENE.**

Le CuDIPS (Cu[II]-[diisopropylsalicylate]) est un mimétique de référence de la CuZnSOD (Mc KENZIE et al., Br. J. Pharmacol. 127, 1159-1164, (1999)) ; le MntBAP (Mn(III) tetrakis (5,10,15,20-benzoic acid) porphyrin) est un mimétique de la MnSOD, possédant également une activité catalase et une activité glutathion peroxydase (Demande PCT/WO 01/12327). L'effet du CuDIPS et du MntBAP sur la survie de souris après injection intrapéritonéale de 1000 mg/kg d'acétaminophène (APAP) a été comparé à celui du Mangafodipir.

Le protocole expérimental est le suivant :

Le Mangafodipir, le MntBAP ou le CuDIPS sont administrés sous forme de bolus, à titre préventif, 2 heures avant l'acétaminophène.

5 Différents groupes d'animaux ont reçu les traitements suivants :

Groupe I : PBS

Groupe II : APAP 1000 mg/kg

Groupe III : APAP 1000 mg/kg ; MntBAP 10 mg/kg

10 Groupe IV : APAP 1000 mg/kg ; CuDIPS 10 mg/kg

Groupe V : APAP 1000 mg/kg ; Mangafodipir 10 mg/kg

La survie des animaux est suivie pendant 24 heures après l'administration d'acétaminophène.

15 Les résultats, exprimés en nombre d'animaux survivants sont illustrés par le tableau II ci après.

Tableau II

Temps (h)	0	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	22	24
Groupe I (n=16)	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Groupe II (n=12)	12	12	10	9	8	6	5	5	4	4	4	3	3	3	2	2
Groupe III (n=12)	12	12	12	12	11	10	10	10	9	9	8	8	8	8	7	7
Groupe IV (n=12)	12	12	11	10	9	7	7	5	5	5	4	4	3	3	3	3
Groupe V (n=12)	12	12	12	12	11	11	11	10	10	10	9	9	9	9	8	8

Ces résultats montrent que :

20 - le Mangafodipir administré préventivement augmente le taux de survie de manière au moins égale au MntBAP ;

- le CuDIPS n'augmente pas le taux de survie de manière significative.

#### Dosage des transaminases

25 Dans une seconde série d'expériences, un groupe de souris a reçu une dose de 500 mg/kg d'acétaminophène ; un second groupe a reçu la même dose d'acétaminophène, et une dose de 10 mg/kg de Mangafodipir administrée 2 h avant l'acétaminophène ; un troisième groupe d'animaux a reçu la même dose d'acétaminophène, et une dose de 10 mg/kg de MntBAP, un quatrième groupe d'animaux a reçu la même dose d'acétaminophène, et une dose de 10 mg/kg de CuDIPS. Les

30

transaminases sériques ASAT sont dosées 12 heures après l'administration d'acétaminophène.

Les résultats sont illustrés par la figure 4.

Légende de la figure 4 :

5 NS : non significatif par rapport aux souris non traitées

\* :  $P < 0.01$  par rapport aux souris non traitées

\*\* :  $P < 0.001$  par rapport aux souris non traitées

10 Parmi les souris ayant reçu 500 mg/kg d'acétaminophène (APAP<sub>500</sub>), on observe, après 12 heures, des activités transaminases 10 fois supérieures à chez celles qui ont reçu préalablement un traitement par le Mangafodipir.

Ces résultats montrent que dans tous les cas, l'administration de Mangafodipir réduit les activités transaminases, qui reflètent la cytolysé hépatique.

## REVENDICATIONS

1) Utilisation du Mangafodipir pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif d'une insuffisance hépatocellulaire.

5           2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite insuffisance hépatocellulaire est d'origine toxique.

10           3) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite insuffisance hépatocellulaire est induite par l'acétaminophène.

          4) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite insuffisance hépatocellulaire est induite par l'alcool.

15           5) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite insuffisance hépatocellulaire se manifeste sous forme d'une hépatite fulminante.

20           6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le Mangafodipir est utilisé pour l'obtention d'un médicament destiné à un traitement préventif.

25           7) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le Mangafodipir est utilisé pour l'obtention d'un médicament destiné à un traitement curatif.

          8) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit médicament est formulé pour permettre l'administration d'une dose de Mangafodipir comprise entre 0,1 et 10 mg/kg/jour.

30           9) Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit médicament est formulé pour permettre l'administration d'une dose de Mangafodipir comprise entre 5 et 50 mg/kg/jour.

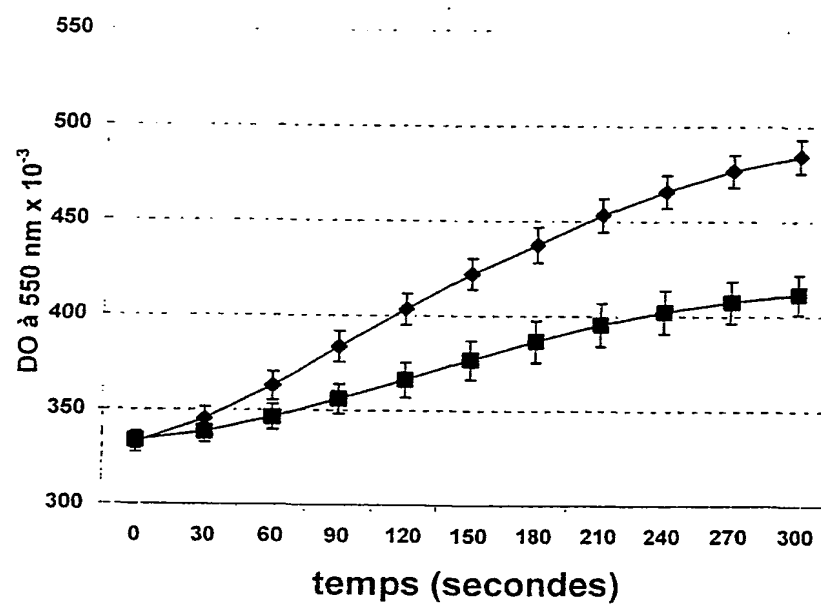


Figure 1

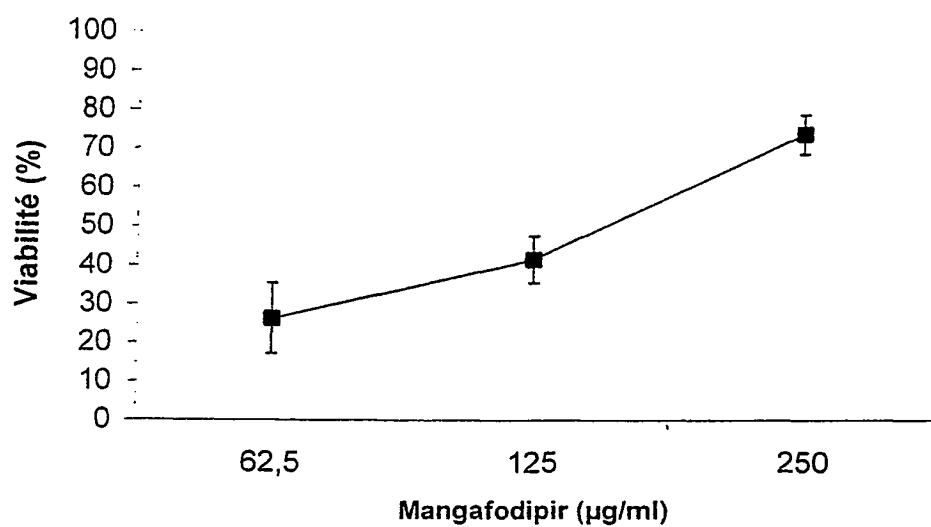


Figure 2



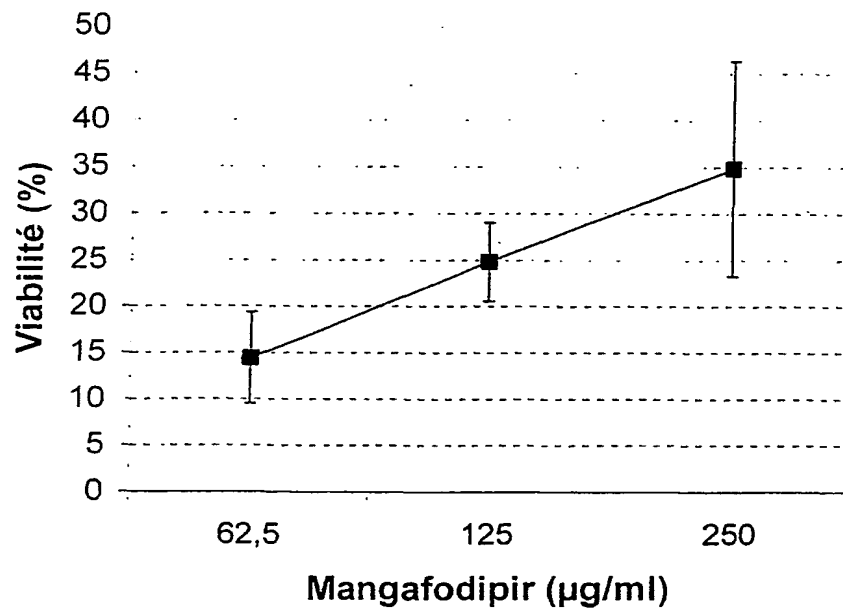


Figure 3

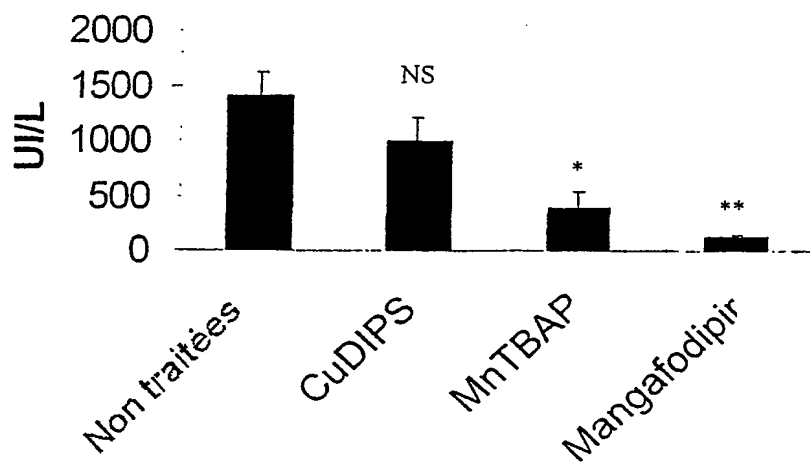


Figure 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01457

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/443 A61K33/32 A61P1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 49409 A (TOWART ROBERTSON ;JYNGE PER (NO); KARLSSON JAN OLOF GUSTAV (NO); N) 31 December 1997 (1997-12-31) abstract page 1, line 1 -page 4, line 5 page 7, paragraphs 3,4; claims 1-18; examples 1,2	1-9
Y	BRUROK, HEIDI ET AL: "Manganese dipyridoxyl diphosphate: MRI contrast agent with antioxidative and cardioprotective properties? in vitro and ex vivo assessments" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1999), 254(3), 768-772, XP001058319 the whole document	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 2002

Date of mailing of the international search report

05/09/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Jakobs

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01457

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARCHAL, G. ET AL: "Comparison between gadolinium-DTPA, gadolinium-EOB-DTPA, and manganese-DPDP in induced HCC in rats: a correlation study of MR imaging, microangiography, and histology" MAGN. RESON. IMAGING (1993), 11(5), 665-74, XP001052675 abstract	1-9
Y	--- OUDKERK M ET AL: "Better liver lesion diagnosis with mangafodipir trisodium (MnDPDP)-enhanced MR liver imaging: A multicenter study comparing MR and biphasic spiral CT." JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 32, no. Supplement 2, 2000, page 136 XP001058294 35th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver; Rotterdam, Netherlands; April 29-May 03, 2000 ISSN: 0168-8278 abstract	1-9
A	--- WO 99 33521 A (GRIFFITH TUDOR ;TOWART ROBERTSON (GB); GRANT DEREK (NO); JYNGE PER) 8 July 1999 (1999-07-08) abstract page 1, line 1 -page 2, line 11 page 4, paragraph 9 -page 5, paragraph 1 page 7, paragraph 4 -page 8, paragraph 1; claims 1,3,11; example 1	1-9
A	--- ASPLUND A ET AL: "MANGAFODIPIR (MNDPDP)-AND MNCL2-INDUCED ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION IN BOVINE MESENTRIC ARTERIES. 1" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND, US, vol. 271, no. 2, 1 November 1994 (1994-11-01), pages 609-614, XP002043389 ISSN: 0022-3565 abstract page 609, column 2, paragraph 2 -page 910, column 1, paragraph 2 page 612, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 1 --- -/--	1-9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01457

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOUNG, STUART W. ET AL: "Detection of hepatic malignancies using manganese-DPDP (manganese dipyridoxal diphosphate) hepatobiliary MRI contrast agent" MAGN. RESON. IMAGING (1990), 8(3), 267-76, XP001052679 the whole document ---	1-9
A	GRAUL, A. ET AL: "Mangafodipir trisodium" DRUGS FUTURE (1997), 22(9), 974-979, XP001058112 the whole document -----	1-9

Form PCT/SA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01457

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9749409	A	31-12-1997	AU 720570 B2	08-06-2000
			AU 3268897 A	14-01-1998
			AU 720621 B2	08-06-2000
			AU 3268997 A	14-01-1998
			BR 9709942 A	10-08-1999
			CA 2258299 A1	31-12-1997
			CA 2259150 A1	31-12-1997
			CN 1228694 A	15-09-1999
			CN 1228703 A	15-09-1999
			EP 0910360 A1	28-04-1999
			EP 0936915 A1	25-08-1999
			WO 9749390 A1	31-12-1997
			WO 9749409 A1	31-12-1997
			JP 2000514044 T	24-10-2000
			JP 2000513351 T	10-10-2000
			NO 985916 A	25-01-1999
			NO 985917 A	25-01-1999
			NZ 333315 A	28-07-2000
			NZ 333357 A	25-08-2000
			US 6147094 A	14-11-2000
			US 6258828 B1	10-07-2001
WO 9933521	A	08-07-1999	AU 1770199 A	19-07-1999
			EP 1054670 A2	29-11-2000
			WO 9933521 A2	08-07-1999
			JP 2001527053 T	25-12-2001
			US 6310051 B1	30-10-2001
			ZA 9811823 A	24-08-1999

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/01457

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/443 A61K33/32 A61P1/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 49409 A (TOWART ROBERTSON ;JYNGE PER (NO); KARLSSON JAN OLOF GUSTAV (NO); N) 31 décembre 1997 (1997-12-31) abrégé page 1, ligne 1 -page 4, ligne 5 page 7, alinéas 3,4; revendications 1-18; exemples 1,2	1-9
Y	BRUROK, HEIDI ET AL: "Manganese dipyridoxyl diphosphate: MRI contrast agent with antioxidative and cardioprotective properties? in vitro and ex vivo assessments" BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1999), 254(3), 768-772, XP001058319 le document en entier	1-9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 août 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/09/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

A. Jakobs

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01457

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MARCHAL, G. ET AL: "Comparison between gadolinium-DTPA, gadolinium-EOB-DPTA, and manganese-DPDP in induced HCC in rats: a correlation study of MR imaging, microangiography, and histology" MAGN. RESON. IMAGING (1993), 11(5), 665-74, XP001052675 abrégé	1-9
Y	--- OUDKERK M ET AL: "Better liver lesion diagnosis with mangafodipir trisodium (MnDPDP)-enhanced MR liver imaging: A multicenter study comparing MR and biphasic spiral CT." JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 32, no. Supplement 2, 2000, page 136 XP001058294 35th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver; Rotterdam, Netherlands; April 29-May 03, 2000 ISSN: 0168-8278 abrégé	1-9
A	--- WO 99 33521 A (GRIFFITH TUDOR ;TOWART ROBERTSON (GB); GRANT DEREK (NO); JYNGE PER) 8 juillet 1999 (1999-07-08) abrégé page 1, ligne 1 -page 2, ligne 11 page 4, alinéa 9 -page 5, alinéa 1 page 7, alinéa 4 -page 8, alinéa 1; revendications 1,3,11; exemple 1	1-9
A	--- ASPLUND A ET AL: "MANGAFODIPIR (MNDPDP)-AND MNCL2-INDUCED ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION IN BOVINE MESENTRIC ARTERIES. 1" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR PHARMACOLOGY AND, US, vol. 271, no. 2, 1 novembre 1994 (1994-11-01), pages 609-614, XP002043389 ISSN: 0022-3565 abrégé page 609, colonne 2, alinéa 2 -page 910, colonne 1, alinéa 2 page 612, colonne 1, alinéa 3 -colonne 2, alinéa 1 --- -/--	1-9



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	YOUNG, STUART W. ET AL: "Detection of hepatic malignancies using manganese-DPDP (manganese dipyridoxal diphosphate) hepatobiliary MRI contrast agent" MAGN. RESON. IMAGING (1990), 8(3), 267-76, XP001052679 le document en entier	1-9
A	GRAUL, A. ET AL: "Mangafodipir trisodium" DRUGS FUTURE (1997), 22(9), 974-979, XP001058112 le document en entier	1-9

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01457

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9749409	A	31-12-1997	AU 720570 B2	08-06-2000
			AU 3268897 A	14-01-1998
			AU 720621 B2	08-06-2000
			AU 3268997 A	14-01-1998
			BR 9709942 A	10-08-1999
			CA 2258299 A1	31-12-1997
			CA 2259150 A1	31-12-1997
			CN 1228694 A	15-09-1999
			CN 1228703 A	15-09-1999
			EP 0910360 A1	28-04-1999
			EP 0936915 A1	25-08-1999
			WO 9749390 A1	31-12-1997
			WO 9749409 A1	31-12-1997
			JP 2000514044 T	24-10-2000
			JP 2000513351 T	10-10-2000
			NO 985916 A	25-01-1999
			NO 985917 A	25-01-1999
			NZ 333315 A	28-07-2000
			NZ 333357 A	25-08-2000
			US 6147094 A	14-11-2000
			US 6258828 B1	10-07-2001
WO 9933521	A	08-07-1999	AU 1770199 A	19-07-1999
			EP 1054670 A2	29-11-2000
			WO 9933521 A2	08-07-1999
			JP 2001527053 T	25-12-2001
			US 6310051 B1	30-10-2001
			ZA 9811823 A	24-08-1999